

UNIVERSITE DE LYON

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE - N° 320

**PROGRÈS ACCOMPLIS
DANS LA
PRÉPARATION DES SÉRUMS
ANTITOXIQUES
(DIPHTÉRIQUES ET TÉTANIQUES)**

(Contribution à l'étude des modalités réactionnelles
des animaux aux méthodes d'hyperimmunisation)

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 3 juin 1942

PAR

Mademoiselle Micheline BIDAUT

Née le 16 Janvier 1915 à Valentigney (Doubs)



LYON

Imprimerie GAUTIER & LAFORET

101, Rue d'Anvers, 101

—
1942



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Progrès accomplis
dans la
préparation des sérums
antitoxiques
(diphthériques et tétaniques)

Contribution à l'étude des modalités
réactionnelles des animaux
aux méthodes d'hyperimmunisation

UNIVERSITÉ DE LYON

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE - N° 320

**PROGRÈS ACCOMPLIS
DANS LA
PRÉPARATION DES SÉRUMS
ANTITOXIQUES
(DIPHTÉRIQUES ET TÉTANIQUES)**

(Contribution à l'étude des modalités réactionnelles
des animaux aux méthodes d'hyperimmunisation)

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 3 Juin 1942

PAR

Mademoiselle Micheline BIDAUT

Née le 16 Janvier 1915 à Valentigney (Doubs)



LYON
Imprimerie GAUTIER & LAFORET
101, Rue d'Anvers, 101

—
1942

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyen Honoraire
Doyen
Assesseur

M. L. HUGOUNENQ.
M. J. LÉPINE.
M. A. MOREL.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. LANNOIS, HUGOUNENQ, PIC, CONDAMIN, PAVIOT,
NICOLAS, VILLARD, NOVÉ-JOSSERAND, TIXIER, COLLET, GAYET, CLUZET,
BÉRARD, COURMONT, GUIART, PIÉRY, CADE, THÉVENOT Léon.

PROFESSEURS

Cliniques médicales
Cliniques chirurgicales
Clinique obstétricale et Accouchements
Clinique ophtalmologique
Clinique dermatologique et syphiligraphique
Clinique neurologique et psychiatrique
Clinique médicale infantile
Clinique gynécologique
Clinique d'oto-rhino-laryngologie
Clinique urologique
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie
Clinique et prophylaxie de la tuberculose
Clinique des maladies infectieuses
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie
Chimie biologique et médicale
Chimie organique et Toxicologie
Matière médicale et Botanique
Parasitologie et Histoire naturelle médicale
Anatomie
Histologie
Physiologie
Pathologie interne
Pathologie générale et thérapeutique
Anatomie pathologique
Chirurgie opératoire
Médecine expérimentale et comparée et Bactériologie
Médecine légale
Hygiène
Pharmacie et Pharmacologie
Hydrologie thérapeutique et Climatologie

MM. FROMENT.
SAVY.
PATEL.
SANTY.
RHENTER.
BONNET.
FAVRE.
ÉPINE J.
MOURIQUAND.
COTTE.
REBATTU.
CIBERT.
TAVERNIER.
DUFOURT.
CHALIER J.
PONTTHUS.
FLORENCE.
MOREL.
MANCEAU.
GARIN.
LATARJET.
POLICARD.
HERMANN.
CORDIER.
DECHAUME.
MARTIN J.-F.
X...
ARLOING (F.).
MAZEL.
ROCHAIX.
LEULIER.
GATÉ.

PROFESSEUR TITULAIRE SANS CHAIRE

Chargé d'un cours d'Embryologie

M. NOEL.

AGRÉGÉS

MM.
GABRIELLE
CHAMBON
REVOL
ENSELME
SEDALLIAN
CREYSEL
DE ROUGEMONT

MM.
P. RAVAUULT
PIGEAUD
CROIZAT
DELORE
JOSSERAND
MORIN
BERTRAND

MM.
CLAVEL
LEVRAU
BANSSILLON
MALLET-GUY
ROMAN
PEYCELON
PIFFAULT

MM.
JOURDAN
FROMENT (R.)
MARTIN (P.-E.)
MOUNIER-KUHN
BROUSSY

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. ROCHAIX, *Président*; A. MOREL, *Assesseur*;
SÈDALLIAN et CHAMBON, *Agrégés*.

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A MES PARENTS

A MON PÈRE ET A MA MÈRE

En gage de profonde reconnaissance
pour la bonté et l'affection dont ils
m'ont toujours entourée.

A MON FRÈRE

A MON FIANCÉ

A MON ONCLE ET A MA TANTE.

A MON ONCLE

Pharmacien

Nous lui sommes reconnaissante d'avoir
guidé nos premiers pas dans notre car-
rière pharmaceutique.

A MON COUSIN

Elève à l'Ecole Polytechnique.

A MES AMIS ET A MES CAMARADES
DE PHARMACIE

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR ROCHAIX

Membre du Conseil supérieur d'Hygiène de France,
Sous-Directeur de l'Institut Bactériologique de Lyon,
Professeur d'Hygiène à l'Université de Lyon.

Nous le remercions de nous avoir
permis d'entreprendre ce travail à l'Ins-
titut Bactériologique de Lyon et de nous
faire l'honneur de présider à notre thèse

A NOTRE MAÎTRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR A. MOREL

Professeur de Chimie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie
de Lyon.

Nous le remercions du très grand hon-
neur qu'il nous a fait en acceptant de
faire partie du jury de notre thèse. Nous
le prions d'accepter nos sentiments de
vive admiration et de reconnaissance.

A NOTRE MAITRE

A MONSIEUR LE PROFESSEUR CHAMBON

Professeur agrégé de chimie à la Faculté de Médecine et de
Pharmacie de Lyon,

Pharmacien-Chef à l'Hôpital de Grange-Blanche.

Les circonstances nous ont amenée à travailler sous sa direction à l'hôpital de Grange-Blanche. Nous avons été très sensible à l'accueil toujours affable qu'il nous a réservé et à la sollicitude avec laquelle il nous a conseillée. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre reconnaissance. Nous le remercions bien vivement d'avoir accepté de faire partie du Jury de notre thèse.

A NOTRE MAITRE

A MONSIEUR LE PROFESSEUR SÉDALLIAN

Professeur agrégé d'hygiène à la Faculté de Médecine et de
Pharmacie de Lyon,

qui nous a proposé le sujet de cette thèse. Il nous a accueilli avec bienveillance dans son laboratoire. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre admiration et notre respectueuse gratitude.

Progrès accomplis dans la préparation des sérums antitoxiques (diphtériques et tétaniques)

(Contribution à l'étude des modalités réactionnelles des
animaux aux méthodes d'hyperimmunisation)

INTRODUCTION

Deux années après la découverte du « poison diphtérique » par E. ROUX et A. YERSIN, BEHRING en 1890 mit en évidence la propriété antitoxique du sang d'animaux immunisés par des injections répétées de doses faibles de toxine diphtérique.

Le sang de ces animaux mélangé à la toxine diphtérique neutralise le poison « in vitro » et cette propriété se trouve intacte dans le sérum débarrassé de tous les éléments cellulaires.

Ce sérum fut obtenu par ROUX et YERSIN pour des usages thérapeutiques à partir de chevaux immunisés d'après les indications suivantes : « Quand on injecte à un animal à doses progressivement croissantes une toxine microbienne, on arrive à vacciner l'animal contre cette toxine et à lui en faire tolérer sans inconvénients des doses considérables, infiniment supérieures à la dose qui injectée d'emblée serait mortelle ». Puis une saignée de plusieurs litres est faite aseptiquement. Le sang après repos et décantation fournit un sérum qui peut neutraliser la toxine microbienne envisagée.

La toxine microbienne sécrétée par les bacilles est obtenue en cultivant sur bouillon soit le bacille de LOFFLER soit le bacille tétanique. Ce bouillon filtré donne un liquide qui sert à immuniser les chevaux.

Les milieux utilisés furent très divers :

YERSIN prépare une macération de viande de veau fermentée, filtre et met le bouillon dans un ballon à fond plat et à large surface. Ce bouillon est stérilisé puis ensemencé. Il est mis pendant 3 à 4 semaines à l'étuve à 37° pour culture ; filtré à la bougie CHAMBERLAND, YERSIN obtenait un liquide de faible toxicité. Une grande quantité était nécessaire pour obtenir l'immunisation des chevaux.

Diverses variantes furent essayées :

NICOLLE utilise des viandes non fermentées.

PARK et WILLIAMS neutralisent le bouillon par une solution de soude.

MACE additionne ce même bouillon de carbonate de calcium.

SPRONCK faisait un bouillon sans viande : eau de levure peptonisée additionnée de chlorure de sodium puis neutralisée par la soude en solution normale. Cette solution est filtrée et stérilisée.

Mais le milieu le plus généralement utilisé fut celui de MARTIN.

Dès 1898, MARTIN cultivait le bacille tétanique sur un bouillon fait d'un mélange d'une macération de viande de veau (fermentant 20 heures à 37° pour l'élimination des sucres) et du produit de l'hydrolyse peptique des panses de porc pendant 14 heures :

500 gr. de viande de veau maigre, hachée, sans tendons,

macèrent à 37° pendant 20 heures dans un litre d'eau.

On passe avec expression.

On additionne de 5 gr. de chlorure de sodium.

On mélange avec parties égales de bouillon de panse préparé d'abord.

On porte à l'étuve à 70°, il y a coagulation des albumines.

On neutralise au tournesol par 7 cc. de soude en solution normale par litre d'eau.

Le bouillon de panse fournit une solution de peptone.

Il est préparé comme suit :

250 gr. d'estomacs de porc hachés.

10 gr. d'acide chlorhydrique pur à 16° Baumé.

1.000 gr. d'eau à 50° de température.

On fait macérer 24 heures.

On porte à l'étuve à 100°, on passe au tamis et sur coton hydrophile. Puis on chauffe à 80° et on alcalinise.

On filtre sur papier CHARDIN, on chauffe de nouveau à 118° pendant 5 minutes, on filtre encore et on stérilise.

Le bouillon MARTIN a fait l'objet de nombreuses critiques. Il a subi diverses modifications afin d'obtenir des cultures de plus en plus riches en toxine, lesquelles servent à l'immunisation des chevaux.

Leur mode de préparation, leur titre de toxicité, la manière dont on les emploie pour traiter les animaux, sont autant de facteurs faisant varier les taux sériques, indépendamment d'autres, nombreux et divers inhérents à la nature même du cheval.

Les progrès et les variations du taux d'antitoxine dans le sérum de cheval feront l'objet de cette étude.

Nous envisagerons les chapitres suivants :

Chapitre premier :

Progrès réalisés dans la technique d'immunisation des chevaux.

Chapitre II :

Progrès réalisés dans l'obtention des toxines de titre élevé.

Chapitre III :

Les taux sériques obtenus.

Chapitre IV :

Résultats obtenus à l'Institut Bactériologique de Lyon.

CHAPITRE PREMIER

Progrès réalisés dans l'obtention des toxines de titre élevé

Jusqu'en 1921-1922 on ne possédait pas de méthodes pratiques permettant d'apprécier l'activité antigène des toxines. Les toxines étaient étudiées soit au point de vue de leur dose Lmn (minima mortelle) soit au point de vue de leur aptitude à fixer l'antitoxine calculée en recherchant la dose L + (limite mortelle).

Les deux titrages exigeaient l'emploi de cobayes.

Les titres obtenus avec le bouillon MARTIN étaient en moyenne : Lmn = 1/200 de cc. environ pour la toxine diphtérique 1/50.000 pour la toxine tétanique.

L + était compris entre 0,05 et 0,3 pour la toxine diphtérique.

RAMON en mettant en évidence la floculation du mélange toxine-antitoxine a donné une méthode permettant d'apprécier l'activité antigène :

« Dans des tubes contenant 5 cc. de l'échantillon à titrer ou 10 cc. si la valeur présumée est forte, on ajoute (1) (RAMON) des volumes progressivement décroissants de sérum étalon : 0 cc. 7, 0 cc. 6, 0 cc. 5, 0 cc. 45, 0 cc. 4,..... 0 cc. 15, 0 cc. 125, etc... On agite les tubes. On porte à l'étuve au B.-M. à 45 degrés pour titrer la toxine tétanique seulement. On surveille l'apparition de la floculation initiale qui d'après le principe de la méthode fournit la valeur du sérum recherchée. » RAMON titre la toxine par rapport à un sérum étalon et préparé d'avance (1) : « Chaque sérum est desséché dans le vide, puis pour l'usage une certaine quantité en poids (par exemple 0,50 gr.) est additionnée d'eau physiologique stérilisée de telle façon qu'un cc. de la solution obtenue titre 300 unités antitoxiques. L'utilisation d'un sérum possédant cette teneur en antitoxine nous paraît commode. Elle permet d'éviter les dilutions ultérieures du sérum ou l'emploi de trop fortes quantités d'antigène. »

Par cette méthode, RAMON établit ainsi une valeur Lf caractérisant chaque toxine ; « cette valeur est exprimée en « unités antigènes » correspondant nombre pour nombre à la quantité d'unités antitoxiques qui fait apparaître la floculation initiale dans 1 cc. de toxine ou d'anatoxine ».

Mais RAMON fait remarquer que « quelques échantillons provenant d'un milieu de culture à base de digestion pepsique de viande de bœuf ou de foie ont donné lieu à une double zone d'opalescence (floculation paradoxale), celle-ci est spécifiquement tétanique ». PRÉVOT a trouvé une méthode simple permettant de distinguer

facilement ces deux floculations en faisant une représentation graphique pour un sérum étalon donné, des floculations successives observées (2) (PRÉVOT).

Il montre qu'il y a deux courbes régulières très distinctes correspondant à chacune des floculations normale et anormale.

Pour obtenir des sérums de plus grande valeur antitoxique on s'est efforcé de préparer des toxines d'un titre plus élevé.

D'une part on a cherché à obtenir des souches plus toxigènes, d'autre part on s'est appliqué à modifier la préparation du bouillon et les conditions de culture des souches microbiennes.

Peu à peu on s'est aperçu que non seulement la valeur antigénique de la toxine importait, mais encore la qualité de cette toxine qui dépendait de la manière dont elle avait été préparée. On essaya de purifier le bouillon.

Nous exposerons dans ce chapitre quels furent les divers progrès réalisés dans l'obtention des toxines actives.

I. — Préparation de toxines diphtériques puissantes.

Au début de la fabrication des toxines destinées à l'immunisation des chevaux, on employait un bouillon préparé selon la formule donnée par MARTIN et ROUX avec de la viande de veau fermentée, additionnée de peptone MARTIN, elle-même obtenue à partir d'une macération de panses de porc dans l'eau chlorhydrique. Ce bouillon étaitensemencé avec des souches de bacille tétanique ou diphtérique provenant des hôpitaux. Elles sécrétaient une toxine faible.

En 1918 AYERS et RUPPT (3) ont essayé d'ajouter de l'acétate de sodium.

En 1923 RAMON a proposé d'amener le bouillon à un pH convenable, qu'il fixa expérimentalement à 7, 8, par addition de solution de soude au bouillon avant la mise en culture (4). Il obtient une toxine tuant au 1/1000 de cc. (RAMON) Avec BERTHELOT il a remarqué que l'addition de phosphate trisodique favorise la culture des bacilles diphtériques (4) (RAMON et BERTHELOT).

En 1925, à la suite des travaux de AYERS et RUPPT et de ABT et LOISEAU (5), RAMON et BERTHELOT ont essayé d'employer l'acétate de sodium pour maintenir le milieu alcalin. Ils ont aussi proposé l'emploi de milieux solides « en incorporant à des liquides nutritifs convenables une proportion de tapioca variant entre 20 et 120 gr. o/oo..., il est facile de rendre liquides les cultures ainsi obtenues en les additionnant, 2 à 4 jours avant de retirer de l'étuve, d'une petite quantité de solution concentrée et stérile d'une amylase convenablement choisie » (6) (RAMON et BERTHELOT).

En 1927, LOISEAU et PHILIPPE présentent une étude des facteurs qui modifient l'évolution des cultures en bouillon peptoné simple. L'eau employée doit être pure, « non javellisée ». Le choix d'une race américaine est indispensable. Les récipients doivent être en verre Pyrex, de préférence neutres ou « verts ». La viande de veau frais, sans tendons ni os, est préférable. La température de stérilisation ne doit pas dépasser 100°. L'addition de phosphates favorise la culture.

En 1932, RAMON et BERTHELOT reprennent les essais avec l'acétate de sodium comme régulateur de

réaction (7). Ils obtiennent un bon rendement. La toxine obtenue passe de 15 à 18 unités antigéniques à 30 unités.

LOISEAU et PHILIPPE dans le même but ont employé le succinate de sodium qui, seul ou associé au glucose, a donné des toxines de 19 à 23 unités avec une réaction très régulière (8). Ils ont signalé une toxine de 30 unités obtenue avec le bouillon suivant :

Macération de viande de veau	400 cc.
Produits d'hydrolyse pepsique	800 cc.

Après stérilisation on ajoute du glucose et de l'acétate de sodium.

Vers 1932, LOISEAU et PHILIPPE obtiennent avec un bouillon glucosé 15 à 19 unités alors que le même bouillon non glucosé produisait 11 à 13 unités antigéniques (9) (LOISEAU et PHILIPPE).

RAMON signale une toxine de 30 unités au lieu de 15 unités, obtenue par l'addition de 5 gr. d'acétate de sodium par litre et 1 gr. de glucose (7) (RAMON).

SCHMIDT (10), HAZEN et HELLER (11) obtiennent des résultats analogues en ajoutant 1 gr. 50 de glucose et 3 gr. de maltose. La toxine préparée est de 17 à 20 unités.

En 1933 MARBE (12) montre l'influence des hydrates de carbone et modifie le bouillon MARTIN de la même manière. Il additionne la culture de 1 gr. 50 de glucose et 3 gr. de maltose ‰. Le pH initial est de 8,2. Par une macération de 10 à 14 jours des panses de porc il obtient une toxine de 17 à 20 unités.

En 1932, LOISEAU et PHILIPPE étudieront tout particulièrement le bouillon de panses de porc dans la fabrication du bouillon MARTIN (13), (LOISEAU et PHILIPPE).

En 1898, MARTIN le préparait en faisant digérer dans de l'eau chlorhydrique 200 gr. de hachis de panses par litre d'eau pendant 12 à 14 heures. LOISEAU fit varier d'une part la quantité de panses de porc, d'autre part le temps de digestion. En mélangeant par parties égales, le bouillon de viande de veau, préparé avec 600 gr. de viande dans un litre d'eau, et le résultat de l'hydrolyse pepsique des panses de porc obtenu d'heure en heure, il arriva en 1932 à la conclusion suivante : plus le temps de digestion est long plus la toxine produite est d'un pouvoir antigène élevé ; toutefois un temps de digestion porté au delà de 24 heures n'est pas nécessaire.

Il donne la formule en 1932 d'un bouillon donnant une toxine de 17 à 19 unités antitoxiques :

Eau	1.000 gr.
Hachis de panses de porc	350 gr.
Acide chlorhydrique pur	10 cc.

Macération de viande de veau :

Viande de veau	600 gr.
Eau	1.000 gr.
Mettre 20 heures à la glacière.	

On ajoute 1 gr. 50 de glucose par litre de bouillon obtenu par mélange des deux liquides (9) (LOISEAU).

En 1934 il précisa : le bouillon de panses de porc doit être mélangé à la macération de viande de veau dans la proportion des $\frac{3}{4}$ ou des $\frac{4}{5}$ du volume total du bouillon. Cela permit l'obtention d'une toxine de 27 à 33 unités floculantes (14) (LOISEAU).

En 1935, Mlle TAYLOR inaugure une technique hardie : elle supprime le bouillon de veau totalement car il

rend le milieu alcalin et cultive le bacille diphtérique uniquement sur bouillon de panses de porc, préparé d'une manière spéciale, et dont l'exposé fera l'objet d'une étude prochaine de Mlle RACLET.

De 1934 à 1938, LOISEAU et PHILIPPE signalent « qu'une réduction de 500 cc. au lieu de 1.200 cc. du volume du bouillon mis en culture, et l'utilisation du maltose associé au glucose et acétate de sodium, leur donne des toxines d'une valeur floculante moyenne de 35,8 unités (15) (LOISEAU et PHILIPPE).

En 1937, HIDA SUZUKI (16) obtient une toxine de 15 unités environ. La fabrication est la suivante :

500 gr. de viande de cheval par litre d'eau.

2 % de peptone de HIDA.

0,5 % de chlorure de sodium.

Ajuster à pH 7,8.

La peptone de HIDA est obtenue par digestion de blanc d'œuf congelé dans un suc gastrique artificiel obtenu lui-même par une macération de panses de porc dans 0,5% d'acide chlorhydrique pendant 2 jours à 37°.

Après 24 à 36 heures de digestion du blanc d'œuf on neutralise par du carbonate de sodium, filtre, sèche et pulvérise. On ajoute à la culture 0,2% de glucose.

En 1941, M. RAMON a proposé un milieu à base de digestion papaïnique dont nous donnons plus loin la formule.

II. — Les bases actuelles de la préparation des milieux pour la toxine diphtérique.

a) *Nécessité d'une aérobie stricte.*

A la suite des travaux de LOISEAU et PHILIPPE, il a été bien mis en évidence que les bacilles diphtériques se développent en grande abondance surtout à la surface du bouillon de culture en formant un voile. « Pour obtenir une production abondante et rapide de toxine diphtérique il est nécessaire de cultiver le bacille de LOFFLER dans un milieu liquide établi en grande surface, en couche mince, les flacons de SPRONCK (Utrecht), les bouteilles de WINCHESTER (Angleterre) doubles de 5 litres couchées et les ballons de FERNBACH employés en France permettant de réaliser ces conditions » (17) (LOISEAU et PHILIPPE).

Le bouillon de culture est employé en couches très minces. Une hauteur de 13 m/m pour un volume de 500 cc. dans des ballons de FERNBACH est la meilleure condition pour l'élaboration d'une toxine rapide (17 et 15).

b) *Nécessité de sucres.*

Les glucides ont été employés depuis fort longtemps par SPRONCK, HITCHENS (18). RAMON, dès 1929, employait le glucose à la dose de 2 ‰. POPE et HEALEY préconisaient l'emploi du maltose (19) qui fut confirmé par MARBE (12), LOISEAU, PHILIPPE, TAYLOR, etc...

Il est bien établi aujourd'hui que les glucides sont nécessaires à la croissance du bacille diphtérique.

On emploie le glucose et le mannose à la dose de 4 gr. par litre de bouillon et maltose 6 gr. par litre. On em-

ploie aussi le galactose et le lévulose à 6 gr. par litre (15) (P. BORDET).

c) *Nécessité d'un correcteur d'acidité.*

Pour corriger l'excès d'acidité produit par la désintégration des glucides par le bacille diphtérique, on additionne le bouillon d'acétate d'ammonium. P. BORDET au premier Congrès des Microbiologistes de langue française a montré que de plus le radical acétique est utilement employé par la bactérie diphtérique.

d) *Nécessité de levure de bière.*

Déjà employée par SPRONCK, puis ces dernières années par RAMON, la levure de bière a été bien étudiée dans son mécanisme d'action par P. BORDET (15). Il montre que l'on peut remédier à l'inconvénient de cultures acides et peu régulières que donne un milieu fait selon les indications de LOISEAU et PHILIPPE et « obtenir régulièrement des toxines de titre très élevé, habituellement compris entre 35 et 45 Lf. par addition de levure de bière ajoutée à la concentration optimum de 5 gr. $^{\circ}/_{100}$ de bouillon.

BORDET a montré « que le traitement du bouillon par la levure, d'une part permet une consommation plus active du sucre par la culture, d'autre part augmente l'aptitude de la culture à se débarrasser des acides résultant de cette consommation, en s'opposant ainsi de façon efficace au développement et surtout à la persistance d'une acidité excessive, nuisible au développement microbien et à la toxinogénèse ».

De plus elle agit aussi, selon lui, en favorisant la combustion de l'acide acétique produit dans le milieu par la désintégration des glucides.

III. — Les principaux milieux employés.

Des milieux synthétiques ont été proposés : (20)

Glycine	0,50 gr.
<i>d</i> -l valine	1 gr.
<i>d</i> -l leucine	0,50 gr.
<i>d</i> acide glutamique	5 gr.
l cystine	200 mmg.
<i>d</i> -l méthionine	2 gr.
l tryptophane	1 gr.
l tyrosine	1 gr.
Acide pimélique	1 mmg.
β alanine	1 mmg.
Acide nicotinique	2 mmg.
Phosphate acide de potassium	2 gr.
Chlorure de sodium	5 gr.
Sulfate de magnésium	0,50 gr.
Sulfate de calcium	0,005 gr.
Eau distillée	1.000 gr.

20 cc. de la solution suivante :

Lactate de sodium	37 gr.
Glucose	7,5 gr.
Maltose	15 gr.
Chlorure de calcium	0,3 gr.
Eau distillée	100 gr.

Les mêmes auteurs préparent un milieu analogue, moins coûteux avec :

Gélatine hydrolysée	25 cc.
Extrait de foie ou de levure	5 cc.
Tryptophane	75 mmg.
Chlorure de sodium	4 gr.
Sulfate de magnésium	0,3 gr.
Eau distillée	1.000 cc.

Ce milieu donne une toxine de 35 unités par cc. Par purification par le sulfate d'ammonium et dialyse,

PAPPEMHEIMER, JOHNSON et ROBINSON élèvent le taux à 45 et même 60 unités.

En 1932 POPE et Lewellyn SMITH (21) ont proposé le milieu suivant pour la culture du bacille diphtérique :

Sulfate de magnésium	0,2 mmg.
Phosphate acide de sodium	1 mmg.
Phosphate acide de potassium	1 mmg.
Lactate de sodium (solution à 50 %)	12 cc.
Glucose.....	2 gr.
Rouge crésol	20 mmg.
Peptone	20 gr.
Eau distillée.....	1.000 gr.
pH 8.	

On stérilise et filtre sur bougie BERKEFELD. Puis on ajoute : 1 mmg. 5 de fer par litre ou 2 mmg. 5 de cuivre.

En 1933, avec HEALEY, ils ajoutent 0,4 % de maltose, ce qui donne un meilleur résultat.

En 1938, à la suite des remarques faites par BERTHA et GARCIA (22) sur l'influence de la concentration en azote aminé sur la production de toxine, Mme Inga FJORD NIELSEN signale des toxines de 100 unités obtenues avec le milieu de POPE et LEWELLYN SMITH (23) modifié. Le bouillon est préparé avec seulement une demi-dose d'émulsion pancréatique, ce qui donne la concentration optimum d'azote et d'azote aminé; la toxine renferme 5,85 mmg d'azote par cc.

C'est un « bouillon de viande de cheval digéré par la trypsine puis après fermentation avec de la levure, additionné de maltose » (24).

Les milieux proposés par G. Ramon.

TOXINE DIPHTÉRIQUE.

La toxine diphtérique est produite par le milieu suivant en 1938 :

Viande de veau 1.000 gr.

Eau 2.000 gr.

Macération à la glacière.

Puis une heure à 45°, une heure à 100°.

Filtrer.

Ajouter :

Peptone 1 %

Chlorure de sodium 0,5 %

Glucose 1 %

Porter à l'ébullition. Ramener à pH 8,3.

Filtrer. Stériliser une heure à 110°. La toxine obtenue titre 40 à 50 unités antitoxiques.

MILIEU A LA PAPAÏNE.

Le milieu suivant est employé avec de bons résultats :

Viande de cheval dégraissée et hachée ... 4.000 gr.

Eau portée à la température de 50° 18.000 gr.

Maintenir à 50° au bain-marie.

Papaïne à 2 ‰ 36 gr.

Chauffer à 85° pendant une heure pour obtenir la liquéfaction de la viande.

Après filtration amener à pH 8,4.

Ajouter levure fraîche : 10 ‰.

Puis chauffer 15 minutes à 90°, filtrer et ajouter de l'acétate de soude à 5 ‰.

On répartit ensuite en ballons de Fernbach à raison de 500 cc. pour un ballon de deux litres. Puis stériliser à l'autoclave à 112° pendant trente minutes.

Aseptiquement on ajoute :

Glucose 1 gr. 25	} en solution de 15 cc.
Maltose 3 gr.	

Ce milieu estensemencé et maintenu à l'étuve à 54° pendant 12 jours puis filtré sur bougie. On obtient un titre de 40 à 50 unités.

TOXINE TÉTANIQUE.

Pour la préparation de la toxine tétanique plusieurs milieux ont été également employés :

Viande de veau	500 gr.
Viande de bœuf	500 gr.

Dégraissier, hacher.

Eau	1.000 gr.
-----------	-----------

Faire macérer 12 heures à la glacière. Puis chauffer une heure à 45° puis une demi-heure à 100°.

Filtrer sur papier.

Ajouter un volume égal de bouillon de panse neutralisé.

Titre l'acidité du bouillon avec une solution de soude N/10 en présence de phénolphtaléine.

Ramener cette acidité à pH par addition de la quantité de soude déterminée par le titrage.

Chauffer le bouillon une demi-heure à 120°.

Filtrer sur papier LAURENT et répartir dans les vases pour culture à raison de 2 litres par récipient. Boucher au coton. Coiffer le goulot d'un cornet de papier filtre et stériliser une demi-heure à 115°.

Le bouillon de panse employé se prépare de la façon suivante :

Dégraissier les panse de porc.

Hacher ensemble les tuniques muqueuses et musculueuses. Placer ce hachis dans l'eau acidulée à 50° de température dans les proportions suivantes :

Hachis de panse	300 gr.
Acide chlorhydrique pur	10 gr.
Eau à 50°	1.000 gr.

Maintenir la température à 50° pendant 12 à 15 heures environ dans des vases en terre vernissée, en grès ou en porcelaine.

La digestion achevée, chauffer le bouillon de panse à 80° pour détruire la pepsine en excès. Laisser reposer plusieurs jours à la température de la chambre. Décanter avec un siphon, chauffer à 80° ce liquide décanté et à cette température, le neutraliser avec une solution de soude concentrée. Il se forme de gros flocons et le liquide se clarifie. Filtrer sur papier.

Le liquide obtenu est une solution de peptone à 4% environ.

Un autre milieu fut employé par la suite. Il a été proposé par RAMON (25) :

Macération de viande de bœuf à 1.000 gr. pour 1.000 gr. d'eau	500 cc.
Peptone de laboratoire (pepsique de viande)	250 cc.
Eau	250 cc.
Chlorure de sodium	10 gr.
Glucose	12 gr.
Poudre de globules rouges cuits	5 gr.

On ajoute un égal volume de liquide au moment de la constitution.

La digestion s'opère durant 24 heures à 56° dans une cuve de fonte. Le liquide, décanté, non alcalisé est clarifié sur filtre papier réparti en flacons de 4 litres chauffés à l'autoclave à 110°, pendant 30 minutes. On répartit dans des marmites de 12 litres environ, globules rouges exceptés.

On chauffe jusqu'à 80° environ et l'alcalinisation est faite au moyen de la solution de soude à 10 %.

Le milieu doit être ajusté à pH 5,8. Il est versé dans des flacons de 2 litres ce qui laisse un espace aéré d'un demi-litre environ.

Dans chaque flacon on a mis 10 gr. de poudre de globules rouges cuits.

La stérilisation s'opère à l'autoclave à 115° pendant 30 à 40 minutes.

Les flacons de 2 litres, après ensemencement, sont portés à l'étuve à 37°.

La filtration est opérée vers le 11^e jour.

IV. — LA PURIFICATION DES TOXINES.

Pour éviter les accidents et les inconvénients causés par les substances étrangères contenues dans les toxines, de nombreux auteurs ont essayé de les purifier.

En 1928, ABT (26) purifie la toxine diphtérique en l'adsorbant par des précipités de phosphate dicalcique

ou tricalcique à l'état naissant. Il sépare la toxine par dissolution des phosphates et dialyse.

En 1931, MM. LEULIER, SEDAILLAN et Mme CLAVEL montrent « qu'il est possible d'isoler toute la fraction active d'une toxine diphtérique en abaissant son pH à 4,7 et en isolant le floculat par une centrifugation rapide » (27).

Ce floculat conserve les propriétés vaccinales et immunisantes de la toxine.

En 1931 SCHMIDT au Danemark (28) emploie la suspension d'hydrate aluminique et extrait la toxine par une cristallisation de phosphates à la glacière.

En 1933, T. SPASOWICZ et Wl. POREBSKI (29) utilisent l'acide benzoïque, en solution dans l'acétone, comme absorbant. Il obtient une poudre très concentrée de toxine diphtérique facilement soluble dans le sérum physiologique à pH 8 ou 8,2.

En 1935 SCHMIDT au Danemark (30) obtient une bonne purification par la méthode d'ultra-filtration.

En 1937, BOIVIN et IZARD (31) font une purification des anatoxines tétaniques et diphtériques par l'acide trichloracétique.

MONROE et EATON (32) montrent qu'on peut éliminer les protéines bactériennes au moyen des méthodes de fractionnement par précipitation au point isoélectrique. Avec une toxine déjà purifiée contenant 13 Lf ils obtiennent en employant l'acide phosphorique une concentration de 135 Lf.

THORELL et NORLIN (33) précipitent, l'un la toxine diphtérique avec l'acétone à la température de 2°, ils

obtiennent un produit purifié renfermant 50 Lf par mmg. de substance sèche, l'autre par cataphorèse.

En combinant les deux procédés les auteurs ont obtenu des préparations très purifiées renfermant 174 à 191 Lf par mmg. de substance sèche c'est-à-dire 50 à 80° de l'antigène original.

Enfin PAPPENHEIMER (20) et de nombreux auteurs ont employé le sulfate d'ammoniaque puis la dialyse.

EATON et GIRON (34) indiquent un mode de purification de la toxine tétanique et de la toxine diphtérique par une solution de chlorure de cadmium à 5° en présence de sels : citrate de sodium en solution à 2% ou chlorure de sodium en solution à 5%.

CHAPITRE II

Progrès réalisés dans la technique d'immunisation des chevaux

La technique actuelle d'immunisation des chevaux résulte d'un ensemble de modifications diverses apportées aux premières méthodes.

Les unes furent relatives à l'antigène lui-même ; ce furent, après de nombreux essais et indépendamment des facilités obtenues par l'obtention de toxines de plus en plus riches, l'emploi de formol qui transforme la toxine en anatoxine et d'adjuvants divers.

D'autres modifications ont trait à la façon dont l'organisme des chevaux est sollicité par l'antigène ; un progrès énorme fut réalisé en particulier dans l'obtention du sérum antitétanique lorsque la vaccination préalable antitétanique fut réalisée.

L'étude des divers progrès réalisés dans la technique d'immunisation des chevaux fera l'objet de ce chapitre.

LES MODIFICATIONS APPORTÉES A L'ANTIGÈNE.

L'ANATOXINE.

LES SUBSTANCES ADJUVANTES.

Avant la découverte de l'anatoxine en 1925 on additionnait au bouillon de culture avant l'emploi des substances très variées telles que la solution iodo-iodurée afin de rendre la toxine moins toxique tout en lui conservant ses propriétés d'antigène.

En 1924, SCHMIDT, WALBUM et MOCH signalent au Danemark l'emploi de chlorure de manganèse en injections : d'abord avant l'immunisation puis après les saignées pour rendre l'organisme apte à une nouvelle production de sérum antitoxique.

En 1925, RAMON puis PICO et FERRARI font au préalable un abcès de fixation (25). Ces deux auteurs signalent dans le même article les propriétés du collargol en injections endoveineuses. Une solution de collargol à 2% injectée pendant trois jours de suite provoque une augmentation moyenne du titre de 20%, alors que les témoins n'accusent qu'une augmentation moyenne de 10% avec le traitement sans collargol.

Tous ces essais ne furent pas comparables à ceux qu'obtint RAMON en 1925 après la découverte de l'anatoxine diphtérique, en additionnant de formol la toxine diphtérique obtenue par le procédé MARTIN (36) (37).

« L'anatoxine diphtérique, contrairement à la toxine d'où elle provient est dépourvue de toxicité... elle confère aux animaux auxquels on l'injecte une immunité active accompagnée de production d'antitoxine. »

Cette anatoxine, d'un effet moins brutal sur l'orga-

nisme que la toxine, permet de mener l'immunisation plus rapidement.

En 1925, RAMON et ROUX dans un compte rendu à l'Académie des Sciences, montrèrent que le tapioca stérilisé, additionné à l'anatoxine dans la proportion de 1 à 3 % et injecté à l'animal, augmentait très sensiblement le rendement. RAMON expliquait ce phénomène par une meilleure utilisation de l'antigène, celui-ci étant absorbé par le tapioca et utilisé plus lentement et de façon plus continue par l'organisme (38). De nombreuses communications furent faites par la suite qui corroborèrent ces résultats :

RAMON (39) (40), SCHMIDT (41).

En 1933, SCHMIDT au Danemark fait connaître que « l'hydrate aluminique préparé selon la technique W. possède un grand pouvoir fixateur vis-à-vis des toxines diphtériques et tétaniques... Des anatoxines diphtériques et tétaniques additionnées d'hydrate aluminique se montrent bien supérieures au point de vue immunisation aux mêmes anatoxines seules (42). »

En 1937, dans la Revue d'immunologie (45) RAMON examine les propriétés de l'huile de vaseline, la saponine, la lanoline et divers autres corps gras au point de vue de leur utilité en tant que substances adjuvantes et conclut que « avec les antigènes enrobés de lanoline l'immunité apparaît au moins aussi précocement qu'avec les antigènes injectés seuls, qu'elle est d'emblée plus intense, que l'effet de l'antigène enrobé ne se prolonge pas au delà d'une certaine limite de temps qui n'excède que de peu celle de l'antigène injecté dans les conditions habituelles ».

En 1938, RAY et DAS signalent que « des chevaux ayant reçu des injections d'anatoxine tétanique mélangée d'abord avec du tapioca puis avec du gluconate de calcium fournissent un sérum meilleur que ceux qui ont reçu seulement l'anatoxine. » Il note une moyenne de 1625 unités contre 617 unités antitoxiques par cc. obtenues auparavant. (44)

Les progrès réalisés dans la technique d'immunisation

Avant 1924, RAMON pour obtenir du sérum antidiphtérique et antitétanique vaccinait des chevaux par des injections fréquentes et répétées de toxines préparées selon la technique de MARTIN. Il employait 2 à 3 litres de bouillon diphtérique ou tétanique. Le traitement des chevaux durait 2 à 3 mois en débutant par des injections de très faibles doses non mortelles de toxine. Peu à peu ces doses étaient augmentées et à mesure que l'immunisation se poursuivait les chevaux supportaient sans accident de hautes doses mortelles.

En 1923, SORDELLI (45) indiquait une méthode résultant de modifications de la méthode de DEAN. Cette méthode est la suivante : il injecte de faibles quantités de toxine diluée dans l'eau physiologique à des intervalles d'un jour avec repos le 7^e jour :

1 ^{er} jour	6 cc.	de toxine diluée au	1/20 ^e .
2 ^e —	6 cc.	—	— 1/20 ^e .
3 ^e —	6 cc.	—	— 1/20 ^e .
4 ^e —	20 cc.	—	— 1/20 ^e .
5 ^e —	20 cc.	—	— 1/20 ^e .
6 ^e —	20 cc.	—	— 1/20 ^e .

Repos le dimanche.

8^e jour 30 cc. de toxine diluée au 1/10^e.

9 ^e	—	30 cc.	—	—	1/10 ^e .
10 ^e	—	30 cc.	—	—	1/10 ^e .

Puis des injections de doses croissantes de toxine pure de telle façon qu'au 21^e jour on en injecte 300 cc. et plus.

En 1925, RAMON et DESCOMBEY en découvrant les propriétés vaccinales de l'anatoxine montrent l'importance de la vaccination préalable antitétanique un an avant l'hyperimmunisation des chevaux. Les animaux sont vaccinés par deux injections de 10 cc. chacune d'anatoxine tétanique à un mois d'intervalle. Ils sont laissés en repos un an avant de commencer le traitement d'hyperimmunisation. (46) (47)

« Les chevaux ayant ainsi acquis artificiellement l'immunité antitétanique se comportent ultérieurement dans la production de l'antitoxine spécifique comme les animaux qui possèdent l'immunité antidiphthérique naturelle, et qui on le sait se révèlent en général bons producteurs d'antitoxine diphtérique (47).

En 1931, la technique était la suivante :

Pour les chevaux destinés à fournir du sérum antitétanique : vaccination un an auparavant par deux doses de 10 cc. chacune d'anatoxine additionnée de 3 gr. 0/00 de tapioca finement pulvérisé et stérilisé. Les chevaux acquièrent ainsi une immunité variable d'environ 1/10^e à 1/3 d'unité antitoxique.

Un an après les chevaux reçoivent pendant 35 jours à intervalles réguliers 10 cc., 50 cc., 100 cc. d'anatoxine additionnée de 1 % de tapioca pulvérisé et stérilisé puis 200 cc., 250 cc., 350 cc., 450 cc., de toxine additionnée de 1 % de tapioca (RAMON) (48).

Les chevaux destinés à fournir du sérum antidiphthérique ayant une immunité naturelle sont hyperimmu-

nisés d'emblée avec de la toxine diphtérique par la même méthode.

Une saignée de 6 à 7 litres est pratiquée quelques jours après la dernière injection.

Des injections de rappel sont faites ensuite pour entretenir le taux antitoxique du sérum.

On alterne ainsi par la suite saignées et injections de toxine au tapioca.

En 1937, RAMON (49) et MACCOLINI (50) montrent par diverses expériences très précises sur le lapin que des injections fractionnées d'anatoxine diluée dans l'eau physiologique produisent une immunité 100 à 200 fois plus forte que la même dose d'anatoxine injectée en une seule fois. Ces injections doivent être faites de préférence au même endroit de la peau. Remarquons que cette méthode déjà indiquée par SORDELLI, reprise par Mme NIELSEN, a fait l'objet d'une remarque de SCHMIDT en 1933. Il provoque une immunité solide à des cobayes en leur injectant pendant 21 jours 1 cc. d'une solution d'anatoxine dans l'eau physiologique à raison de 1 unité floculante pour 20 cc. La même dose injectée en une seule fois ne provoque pas d'immunité pouvant protéger le cobaye.

En 1938 Mme NIELSEN reprend les travaux de SORDELLI et obtient de bons résultats avec la méthode suivante :

La toxine employée est fabriquée à partir de la technique de POPE et SCHMIDT et titre 100 unités antigènes : (51) (Mme NIELSEN).

1 ^{er} jour	6 cc.	d'anatoxine diluée au	1/20 ^e .
2 ^e —	6 cc.	—	— 1/20 ^e .

3 ^e	—	6 cc.	—	—	1/20 ^e .
3 ^e	—	6 cc.	—	—	1/20 ^e .
4 ^e	—	20 cc.	—	—	1/20 ^e .
5 ^e	—	20 cc.	—	—	1/20 ^e .
6 ^e	—	20 cc.	—	—	1/20 ^e .

Repos le 7^e jour.

8 ^e jour	30 cc.	d'anatoxine diluée au	1/10 ^e .
9 ^e	—	30 cc.	— 1/10 ^e .
10 ^e	—	30 cc.	— 1/10 ^e .
11 ^e	—	100 cc.	— 1/10 ^e .
12 ^e	—	100 cc.	— 1/10 ^e .
13 ^e	—	100 cc.	— 1/10 ^e .

Repos le 14^e jour.

15 ^e jour	15 cc.	d'anatoxine non diluée.
16 ^e	—	30 cc. — —
17 ^e	—	50 cc. — —
18 ^e	—	75 cc. — —
19 ^e	—	100 cc. — —

Repos le 20^e jour et le 21^e jour.

23^e jour 100 cc. de toxine.

Repos 7 jours.

Puis nouvelle injection de 400 à 600 cc. de toxine.

Saignée 7 jours après la dernière injection.

De bons résultats furent obtenus.

En 1939, RAMON donne un résumé des progrès réalisés dans ses laboratoires : (52)

En 1924, 8 à 12 semaines, 15 injections, 2.000 à 3.000 cc. de toxine : titre 400 u. a.

En 1927, 35 jours d'hyperimmunisation, 8 injections d'anatoxine de 10 unités, 1.500 cc. : titre 600 u. a.

En 1931, 24 jours d'hyperimmunisation, 7 injections dont 3 avec du tapioca, 1.400 cc. d'anatoxine de 15 à 20 unités : titre 750 u. a.

En 1938, 18 jours d'hyperimmunisation, 6 injections, 1.000 cc. d'anatoxine de 40 unités au tapioca : titre 1.250 u. a.

LES MÉTHODES EMPLOYÉES ACTUELLEMENT.

a) *Choix des animaux.*

A la suite des travaux de RAMON on choisit parmi les animaux destinés à fournir du sérum antidiphthérique ceux qui présentent une réaction de SCHICK positive, le taux d'antitoxine naturelle que contient leur sérum important peu.

Les chevaux destinés à fournir du sérum antitétanique ne présentent jamais d'immunité naturelle ; soit celle-ci leur est conférée artificiellement par deux injections de 10 cc. chacune d'anatoxine tétanique un an avant de subir le traitement d'hyperimmunisation, ou bien ils sont choisis parmi les chevaux déjà vaccinés antérieurement contre le tétanos.

b) *Rythme des injections.*

A la suite de travaux de RAMON on a vu que les anatoxines et toxines antiténiques ou antidiphthériques injectées à des intervalles rapprochés ont une grande influence sur le résultat final.

RAMON a signalé dernièrement une durée de 18 jours d'hyperimmunisation (53).

Par l'emploi de l'anatoxine tétanique pour commencer l'hyperimmunisation on peut actuellement accélérer le rythme des injections et continuer par la toxine tétanique de valeur antigénique élevée.

Le rythme des injections signalé en 1939 dans le Bulletin et Mémoires de la Société Médicale des Hôpitaux de Paris par RAMON est le suivant :

6 injections en 18 jours :

20 cc., 50 cc., 100 cc., 150 cc., 250 cc., 400 cc., anatoxine au tapioca.

Saignée 27 jours après la première injection.

CHAPITRE III

Les taux sériques obtenus

Les nombreuses améliorations apportées soit à la préparation de la toxine destinée à l'immunisation des chevaux, soit à la technique d'immunisation ont abouti à la fabrication de sérums antitétaniques et antidiph-tériques dont la moyenne des taux d'antitoxine s'est sensiblement accrue depuis le début de leur fabrication.

Nous exposerons dans ce chapitre quels sont les taux sériques obtenus par les différents auteurs dans la production du sérum antitétanique et du sérum antidiph-térique.

LES TAUX SÉRIQUES ANTITÉTANQUES.

Avant 1924, RAMON obtenait une moyenne de 100 u.a. par cc. (15).

En 1925, il signale une moyenne de 700 u.a. par cc. (56).

En 1926, SCHMIDT et MADSEN au Danemark obtiennent 875 u.a. et 1470 u.a. par cc.

En 1930, RAMON signale un minimum de 1200 u.a. par cc. et un maximum de 10.000 u.a. par cc. Une moyenne de 4800 u.a. est signalée dans un compte rendu de la Société de Biologie. (57)

En 1938, dans la Revue d'Immunologie il signale les résultats suivants :

Les taux sériques obtenus sont de 1500 à 10.000 u.a. par cc. avec une moyenne de 4.000 u.a. par cc.

En 1938, RAY et DAS (58) après avoir obtenu un maximum de 617 u.a. par cc. en employant des méthodes différentes obtiennent 1.625 u.a. par cc. Par ailleurs ils signalent encore une moyenne avant 1938 de 470 unités antitoxiques par cc.

NUMATA au Japon (59) note des taux de 2.000 à 3.500 u.a. par cc.

A l'Institut Pasteur de Lyon nous avons obtenu en 1932 un maximum de 900 u.a. par cc., en 1939 une moyenne de 650 à 700 u.a par cc. avec des toxines très fortes et les méthodes proposées par RAMON.

LES TAUX ANTIDIPHTÉRIQUES.

En 1903, KORSHUM, NEDRIGAILOFF, OSTRIANINE (60) obtenaient 100 u.a. de moyenne et signalent avec de nouvelles méthodes 1.000 u.a. par cc.

En 1905, W.-R. HUBBERT (Michigan) (61) note 300 à 500 u.a. par cc.

En 1908, BLUMENTHAL à Moscou (62) note 700 à 900 u.a. titrées par la méthode d'EHRlich.

En 1923, RENAUX en employant la méthode de SORDELLI (63) obtient 500 à 950 u.a. par cc. RAMON à la même époque obtient une moyenne de 400 u.a. par cc.

En 1931, le même auteur obtient une moyenne de 800 u.a. par cc.

RAMON dans un compte rendu de la Société de Biologie (64) donne un résumé des principales étapes accomplies dans la production de sérum antidiptérique.

Avant 1924 (avant l'anatoxine) 8 à 12 semaines d'immunisation, 2 à 3 litres de toxine utilisés.

Résultats 400 u.a. par cc.

En 1927, après 35 jours d'hyperimmunisation et l'emploi de 1.300 cc. d'anatoxine (10 unités).

Résultats 600 u.a. par cc.

En 1931, 24 jours d'hyperimmunisation, 1.400 cc. d'anatoxine (15 unités), 7 injections dont 3 avec addition de tapioca.

Résultats 750 u.a. par cc.

En 1938, 18 jours d'hyperimmunisation, 1 litre à peine d'anatoxine (40 unités) additionnée de tapioca en 6 injections.

Résultats 1.250 u.a. par cc.

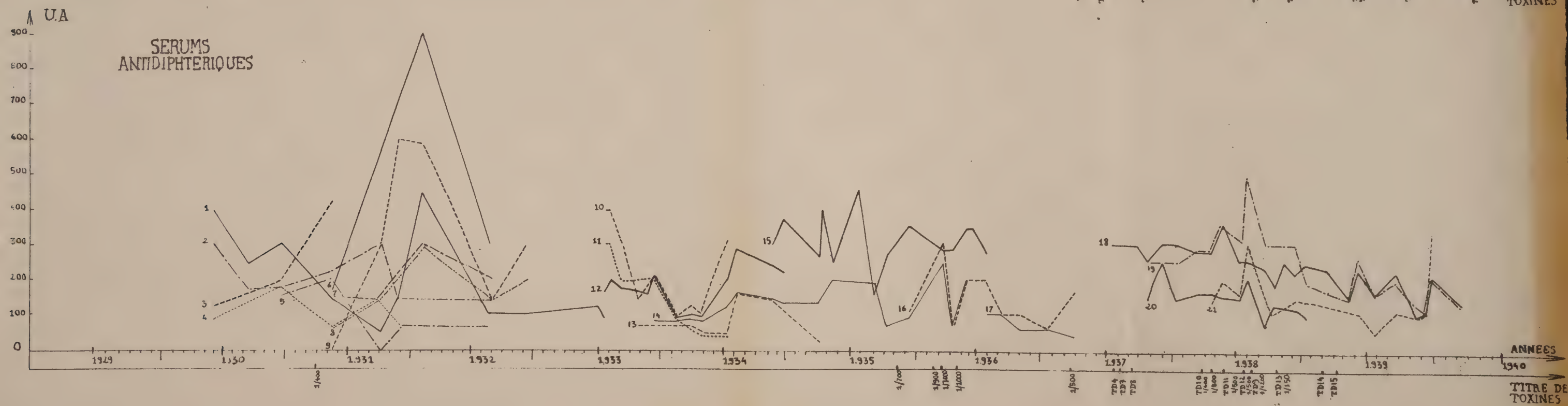
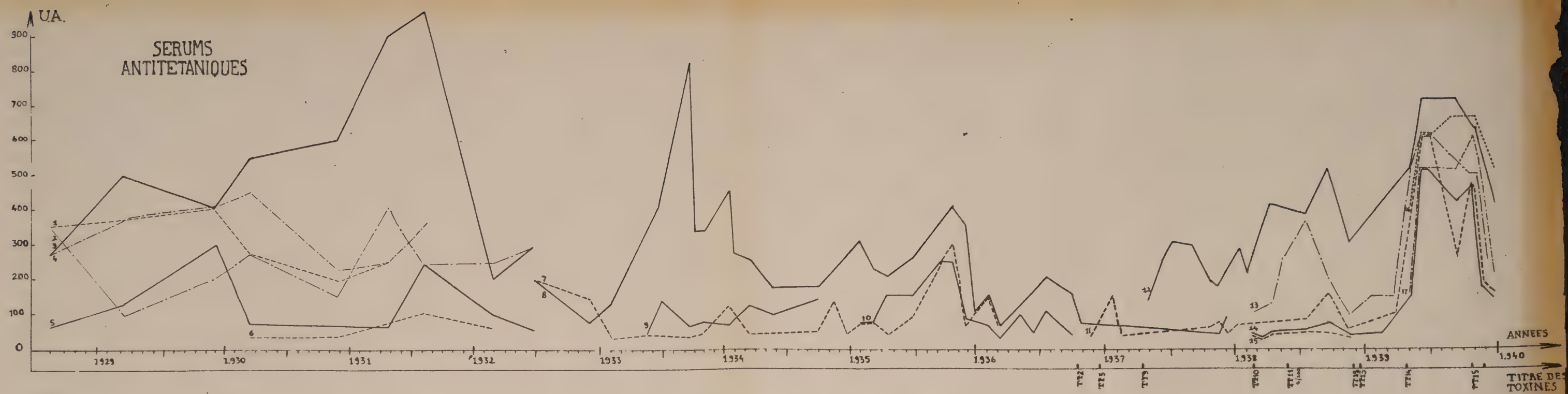
Dans la Revue d'Immunologie de sept. 1939 il signale un maximum de 2.800 u.a. par cc.

En 1938, Mme Inga FJORD NIELSEN signale avec une nouvelle méthode (modification de celle de SORDELLI) des taux de 800 à 2.200 u.a. par cc.

En 1911 on obtenait à l'Institut Pasteur de Lyon avec une toxine au 1/30^e, 50 à 250 u.a. ; en 1913, 400 u.a. par cc. avec une toxine tuant au 1/100^e.

En 1931, nous obtenions des taux variant entre 300 et 900 u.a. par cc.

En 1938, nous obtenons un maximum de 500 u.a. avec les mêmes méthodes bien que les toxines employées soient plus fortes (1 /1.200^e de cc.).



CHAPITRE IV

Résultats obtenus à l'Institut Bactériologique de Lyon

Nous présentons ici les courbes d'immunisation de l'ensemble des chevaux traités à l'Institut bactériologique.

Lorsqu'on analyse les courbes d'immunisation des chevaux poursuivies depuis 1930 jusqu'en 1939, on voit qu'il existe tout d'abord un facteur individuel dans l'aptitude à répondre aux injections immunisantes qui établit entre les chevaux des différences considérables et rend déjà à lui seul toute interprétation très difficile. L'existence de ce facteur individuel est une chose connue depuis longtemps, qui ne peut s'interpréter en aucune manière.

Il semble que l'étude d'un même cheval, dont on suivrait la courbe d'immunisation pendant quelque temps et chez lequel on assisterait, sous l'influence de divers antigènes, à des modifications brusques de sa courbe

individuelle, serait instructive ; malheureusement cette expérience ne semble pas possible. Il apparaît plutôt qu'un cheval soumis à des injections d'hyperimmunisation fait très rapidement le taux maximum d'antitoxine qu'il peut produire ; sa courbe ne fournit ultérieurement que des oscillations insuffisantes. On ne retrouve pas dans la suite les mêmes taux antitoxiques maximum qu'au début. Il maintient en effet très mal des taux antitoxiques élevés et les renouvelle rarement. Ce fait est peu évident sur les courbes présentées. Il apparaît dans des recherches qui seront présentées ultérieurement. En le signalant, nous anticipons sur des constatations qui seront développées dans d'autres travaux.

Les travaux contemporains, en particulier ceux de M. RAMON, ont supprimé l'influence de ce facteur individuel en se limitant à l'étude des titres moyens obtenus chez les chevaux à différentes époques. Comme le calcul est fait en prenant la moyenne du titre antitoxique obtenu chez les différents chevaux, la cause d'erreur signalée plus haut se trouve éliminée. Nous avons préféré prendre les courbes développées qui donnent une image des possibilités réactionnelles de l'ensemble des animaux.

2° Les recherches de ces dernières années et en particulier celles de M. RAMON, ont montré que les taux moyens antitoxiques obtenus chez les chevaux dépendaient principalement de la valeur antigène des toxines utilisées pour leur immunisation. Ainsi on lit très nettement dans les publications de cet auteur que la valeur antigène augmente au fur à mesure que l'on emploie des toxines dont le pouvoir antigène intrinsèque mesuré

par la floculation s'élève de 6 à 10 unités, 15, 20, 30 unités et même davantage.

En fait il semble que non seulement les propriétés des pouvoirs antigènes intrinsèques des toxines ont augmenté mais que les méthodes d'immunisation se sont modifiées et que, en particulier, la pratique des injections répétées à doses rapidement croissantes ait permis l'obtention de taux antitoxiques qui étaient inconnus jusqu'alors.

Cette méthode d'immunisation se rapproche beaucoup de celle de SORDELLI qui utilise des injections quotidiennes et croissantes. Elle a une part considérable dans les modifications ascensionnelles obtenues dans la réponse à l'immunisation des chevaux.

Les courbes que nous présentons correspondent à une période où, à l'Institut Bactériologique, on ne se souciait ni de modifier les méthodes d'immunisation, ni d'obtenir des toxines élevées. Ce n'est qu'ultérieurement que l'on s'est préoccupé après 1939 de s'adapter aux techniques modernes qui concernent les deux points signalés plus haut.

Tous les taux d'immunisation sont obtenus par une technique uniforme d'immunisation ainsi que le résume les tableaux nos I et III, les chevaux étant au début injectés par doses minimales, les doses d'hyperimmunisation de 300 à 400 cc. de toxine n'étant atteinte qu'après 3 à 9 mois de traitement.

En ce qui concerne les toxines qui ont été préparées et utilisées pour l'immunisation, on s'est servi longtemps du milieu ordinaire de MARTINensemencé avec le bacille A.M.7. Ce n'est qu'un peu plus tard, à partir du 25 avril

1939, que l'on a préparé les milieux selon les indications de M. RAMON : bouillon de veau et de panse glucosé, maltosé avec addition d'acétate de sodium et amené à pH franchement alcalin.

Comme on le voit d'après les taux des toxines évaluées de façon assez irrégulière, d'assez grandes variations existent entre celles-ci.

Lmn oscillant entre $1/200^e$ et $1/1200^e$.

L+ présentant des oscillations encore plus grandes puisqu'elle était de 0,085 à certaines époques et 0,7 à d'autres.

De même pour la toxine tétanique, on a utilisé successivement le milieu de bouillon de veau et bœuf mélangé au bouillon de panse, ultérieurement les milieux dont la formule a été donnée par RAMON : peptone de viande additionnée de poudre de sang.

Si les modifications apportées aux toxines s'inscrivent, comme nous le verrons plus loin, sur nos courbes, l'ensemble des titres qui nous intéressent de 1930 à 1939 permet des interprétations dans lesquelles n'interviennent que d'une façon accessoire l'influence de la qualité antigène des milieux utilisés.

1) Lorsque l'on analyse les courbes que nous présentons et qui correspondent à des chevaux ayant servi plusieurs mois et même plusieurs années à la préparation des sérums, on voit que dans l'ensemble ces courbes présentent des irrégularités et cela malgré la continuation des injections d'hyperimmunisation qui étaient mensuelles. Toutes dessinent des clochers suivis de périodes de décroissance, l'ampleur de ces clochers étant variable suivant les animaux et traduisent ainsi l'aptitude de

chaque cheval, le temps pendant lequel la courbe monte variant de 8 mois à 1 mois. L'animal fournit un maximum puis la valeur antitoxique de son sérum baisse *même si l'on poursuit les injections*. Le fait est surtout notable sur la première partie de la courbe des sérums antidiphthériques où l'on voit un clocher présenté simultanément par les chevaux *Josseline, Galopin, Mirba et Marinette*. Ce clocher, étendu sur plusieurs mensualités, a été suivi d'une période de déclin s'étendant sur des mensualités identiques.

Ce fait est aussi net sur les courbes antitétaniques relevées pendant 1931-1932 ; 1933-1934 ; 1939-1940.

Le caractère de ces courbes est très remarquable et permet deux observations :

a) Ces courbes sont identiques à celles que l'on obtient lorsqu'on suit l'immunisation d'animaux pendant un temps très court et lorsqu'on évalue en particulier par titrages fréquemment répétés les modifications antitoxiques des animaux ayant reçu une seule injection d'antigène. Dans de telles expériences qui ont été rapportées par MM. SEDAILLIAN, JOURDAN et Mme CLAVEL (66), on voit que des lapins qui ont reçu des injections de rappel commencent leur ascension antitoxique vers le 4^e jour après les injections et atteignent leur maximum vers le 13^e jour, puis décroissent et la vitesse de la chute du taux antitoxique est fonction de l'ampleur du mouvement ascensionnel, d'autant plus rapide que le point maximum a atteint un taux plus élevé, d'autant plus lente qu'il a atteint un taux plus bas, de telle sorte que si à la base on trace un trait horizontal, le triangle dessiné par la courbe antitoxique et cette

ligne présente un angle qui est d'autant plus aigu que l'ascension a été plus rapide.

Si l'observation de l'élévation de la courbe à la suite d'une seule injection de rappel s'explique par la notion que les antitoxines croissent puis se transforment puis décroissent, pendant que l'antigène s'élimine, il est plus curieux de voir de semblables courbes lorsque les animaux continuent à subir des injections répétées d'antigènes et qu'ils sont toujours régulièrement hyperimmunisés; leur taux des toxines étant titré à intervalles éloignés.

Il est difficile d'interpréter ce fait. Ce qui paraît plus vraisemblable c'est d'admettre que tout animal passe au cours d'une hyperimmunisation continue par des phases pendant lesquelles il est actif et réagit efficacement par la production d'antitoxines et des phases pendant lesquelles il est inactif, phases qui suivent les premières et pendant lesquelles les injections d'antitoxines ne font subir que des oscillations minimales aux taux antitoxiques du sérum, l'ensemble continuant à baisser.

b) Comme on le voit sur les courbes il y a des périodes pendant lesquelles les animaux ont leur taux sérique qui croît et décroît simultanément et d'autres pendant lesquelles l'ensemble des réponses obtenues est moyen, sans grandes variantes; le fait est remarquable pour les sérums antitétaniques de la période 1931-1939 et 1939-1940.

Pendant 1931-1939 les animaux ont reçu des toxines de valeur très moyenne et même dont la dose Lmn était plutôt basse; au contraire la courbe des taux antitoxiques obtenus pendant 1939-1940 qui s'est traduite

par une élévation brutale du taux du sérum de tous les animaux, a très nettement correspondu à l'emploi de toxines préparées selon les indications de RAMON et dont Lmn s'est révélée brusquement beaucoup considérable. Ce fait est moins net pour le sérum antidiphthérique où il y a eu souvent des discordances et où une seule fois en 1931-1932 tous les animaux ont répondu parallèlement. Pendant cette période de 1931-1932 nous n'avons pas employé des toxines particulièrement élevées, $L +$ était 0,18 à 0,20, toutes choses étant égales du côté des méthodes d'hyperimmunisation. Il semble donc que la qualité antigène des toxines influence les taux antitoxiques obtenus en réponse. Mais chaque ascension de la courbe est suivie malgré les injections d'une décroissance. Cette influence ne persiste donc pas et ne s'exerce que pendant un temps très court.

Entre les périodes pendant lesquelles les animaux présentent un maximum du taux sérique on voit sur les courbes des temps pendant lesquels le taux de leur sérum, sans s'élever notablement se maintient en plateaux. Ces périodes sont très difficiles à interpréter. Il est possible que les animaux aient été saisis et étudiés postérieurement à une époque où l'ascension brutale signalée plus haut était déjà effectuée et où ils sont en période inactive au point de vue production. Comme nous l'avons indiqué au début notre travail se rapporte à une période où on ne s'est préoccupé ni de la qualité antigène des toxines ni de l'influence que les méthodes pouvaient avoir sur l'immunisation.

Les résultats sont donc surtout prémonitoires, d'autres résultats obtenus ultérieurement avec lesquels ils

seront comparés. Sans vouloir préjuger de ces résultats nous pouvons cependant faire remarquer la complexité de ces faits concernant l'étude des réponses des animaux aux antigènes. Ils dépendent 1^o) de l'aptitude de chaque cheval, aptitude qui est peut-être influencée par une immunisation préalable lointaine (immunisation spontanée occulte).

2^o) De la qualité des antigènes qui elle-même varie avec la composition du milieu, les qualités de la souche employée pour la préparation de la toxine, l'abondance de la culture obtenue et le temps de la culture.

3^o) De la méthode suivie pour l'hyperimmunisation et de la plus ou moins grande rapidité avec laquelle celle-ci est conduite.

Ces multiples paramètres rendent très difficile l'interprétation des faits signalés dans les travaux contemporains. Nos courbes qui s'établissent indépendamment de tous ces facteurs ont la particularité de montrer l'existence d'oscillations chez les animaux immunisés, de longues périodes pendant lesquelles les taux sériques croissent et d'aussi longues périodes pendant lesquelles l'animal est incapable de donner une réponse satisfaisante aux injections d'hyperimmunisation.

CONCLUSIONS

1) Nous analysons dans ce travail les méthodes d'immunisation des chevaux destinés à la production de sérums antitoxiques et nous exposons les améliorations apportées dans ces dernières années soit à la préparation des toxines soit aux protocoles des injections.

Nous exposons les résultats acquis à l'INSTITUT BACTÉRIOLOGIQUE DE LYON pendant une période de 10 ans qui a précédé l'application des techniques modernes.

2) Les courbes des antitoxines obtenues chez les chevaux injectés régulièrement et mensuellement, montrent que les animaux subissent de temps à autre de fortes poussées dans le taux antitoxique de leur sérum. Ces poussées correspondent peut-être à l'emploi de toxines de valeur plus élevées, mais elles sont toujours suivies, malgré la poursuite des injections, de chute antitoxique.

3) Le temps mis par chaque animal pour atteindre un taux plus élevé est identique à celui qu'il met pour revenir à la moyenne habituelle de ses réponses aux injections. Ces ascensions suivies de descentes s'échelonnent sur plusieurs mois.

4) Les courbes ainsi obtenues sont identiques à celles que donnent les lapins chez lesquels on pratique une seule injection de rappel. Celle-ci provoque brusquement une ascension antitoxique suivie aussitôt d'une chute qui s'échelonne sur une période de temps égale à celle de l'ascension.

5) Ainsi tout se passe comme si les animaux passaient par des périodes d'activité réactionnelle aux injections suivies de périodes d'inactivité pendant lesquelles la poursuite d'une immunisation reste inefficace pour relever les taux antitoxiques.

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,
ROCHAIX

Vu :

LE DOYEN,
J. LÉPINE

Vu et permis d'imprimer,

LYON, le 9 Avril 1942.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
P. E. GAU

I

TITRAGES DES TOXINES TÉTANIQUES EMPLOYÉES
POUR LA PRODUCTION DE SÉRUM ANTITÉTANIQUE

	20-1-33	L + = 0,9
TT1	8-36	L + = 0,9
TT2 (ana.)	oct. 36	
TT3 (ana.)	déc. 36	
TT.6 (ana.)	réservée à Tulipe, Cellule.	
TT9 (ana.)	avril 37	
TT10 (ana.)	sept. 37	
TT11	avril 38	
TT12 (ana.)	sept. 38	
TT13	déc. 38	
TT14	11-4-39	Lmn. 1/5000 ^e
TT15	sept. 39	1/5000 ^e

II

CHEVAUX PRODUCTEURS
DE SÉRUM ANTITÉTANIQUE

1927. Surtout	9 mois	mort 7 juillet 32.
Gamin		vendue juillet 31.
Cadoue		mort 7-9-31.
1926. Quinquet	6 mois	mort 6 juin 32.
1926. Crapouillot	8 mois	mort 13 août 32.
1928. Crémone	5 mois 12 jours	repos février 32.
1931. Chevron	5 mois 14 jours	mort.
1932. Pelos	5 mois 8 jours	normal févr. 37.
1932. Halifax	8 mois	mort 1 ^{er} nov. 34.
1932. Princesse	8 mois	repos.
1936. Pompon	8 mois	
1936. Cellule	6 mois	repos 2-4-40.
Isly		repos 2-4-40.
Grenouille		morte le 23-12-40.
Belle Espérance		passé normal 10-5-39
1932. Jouvence	6 mois 17 jours	
1932. Etoile Polaire	6 mois 17 jours	

IV

TITRAGES DE TOXINES DIPHTÉRIQUES EMPLOYÉES
POUR L'IMMUNISATION DES CHEVAUX

	9- 8-28	Lmn 1/400 ^e	
	13-10-28	Lmn 1/200 ^e	
	22-12-28		L + = 0,085
	4- 1-29		L + = 0,4
	6-10-29	Mmn = 1/150 ^e	
	15-11-29	1/500 ^e	
	8-12-29	1/600 ^e	
	15- 2-30	> 1/800 ^e	
	25- 3-31		L + = 0,18
	9-10-33		L + = 0,20
	6-11-33	> 1/500 ^e	
	12-12-33	1/400 ^e	
	15-12-33	1/200 ^e	
	12- 5-33	1/800 ^e	
	23- 8-35	1/800 ^e	
	10- 9-35	1/1000 ^e	
	16- 3-36		L + 0,10
	17- 4-36		L + 0,065
	8- 7-36	1/1500 ^e	
	17- 9-36	1/1000 ^e	
TD1	26-10-36		L + = 0,71
TD2	7-12-36	ana	
TD4	22- 1-37	ana	
TD5	22- 1-37	ana	
TD7	2- 2-37	ana	
TD8	24 -2-37	ana	
TD9	26-10-37		1/1200 ^e
TD10	29- 8-38		1/400 ^e
TD11	16-11-38		1/500 ^e
TD12	10- 1-39		1/500 ^e
TD13	11- 4-39		1/600 ^e
TD14	28- 8-39		
TD15	11-10-39		
TD16	11-12-39		

III

CHEVAUX PRODUCTEURS DE SÉRUM ANTIDIPHTÉRIQUE (1)

1928.	Galopin	5 mois 20 jours	vendu 3-2-33
	Noiraud		— 21-2-32.
1927.	Coonas	9 mois 17 jours	
	Apt	3 mois	passé producteur de sérum normal 12-5-31.
	Touny		vendu févr. 32
	Josseline		morte 15 avril 32.
1930.	Attros	3 mois (cuivre)	— 17 mai 32.
	Marinette		vendue 3-2-33.
	Comète	6 mois 26 jours	mort 6-5 34.
	Rebus	6 mois 26 jours	repos 4- 1-34.
1932.	Hova	3 m. 20 j. (cuivre)	mort 28-7-34.
	Rose veloutée	6 mois 26 jours	passé tétan. déc.35.
	Catherine	6 mois 26 jours	mort 17-10-34.
1933.	Cervantès	7 mois	mort 4- 2-36.
1934.	Torpille	5 mois	normale 1-1-37.
	Algèbre	7 mois	
1936.	Téléphone	6 mois	
	Venise	6 mois	mort le 4-7-38.
1937.	Voltaire	7 mois	— 1-7-39.

(1) Date du début de l'hyperimmunisation.

(2) Fin de ces animaux produisant du sérum.

BIBLIOGRAPHIE

1. RAMON. — Usage courant de la floculation pour l'évaluation de l'activité antigénique de la toxine et de l'anatoxine tétanique. Comptes rendus de la Société de Biologie, 1938, t. 127, p. 1163.
2. PRÉVOT. — Discrimination graphique entre la floculation vraie et paradoxale dans le titrage de la toxine tétanique par la méthode de Ramon. Comptes rendus de la Société de Biologie, 1938, t. 127, p. 1166.
3. AYERS et RUPT. — *Journal of Infect. Dist.* 1918, t. 33, p. 188.
4. RAMON. — Comptes rendus de la Société de Biologie, 1923, p. 1343.
5. ABT et LOISEAU. — Annales de l'Institut Pasteur, 1925, 1925, t. 39, p. 114.
6. RAMON et BERTHELOT. — Sur l'emploi du tapioca dans les milieux de culture. Comptes rendus de la Société de Biologie, t. 93, p. 896.
7. RAMON et BERTHELOT. — Nouveaux essais sur la production de toxine et d'anatoxine diphtérique de valeur intrinsèque élevée. Comptes rendus de la Société de Biologie, 1932, t. 110, p. 530.
8. LOISEAU et PHILIPPE. — Variations du pouvoir antigène de la toxine diphtérique dans ses rapports avec la composition du milieu de culture. Comptes rendus de la Société de Biologie, 1933, p. 131, t. 112.
9. LOISEAU et PHILIPPE. — Importance des produits de l'hydrolyse pepsique des panes de porc et de leur temps de digestion dans la production de la toxine diphtérique. Comptes rendus de la Société de Biologie, 1932, t. 109, p. 168 et 266.

10. SCHMIDT. — Sur la toxicité des toxines additionnées d'hydrate d'aluminium ou de tapioca. Société Danoise de Biologie, 13 mars 1931.
11. HAZEN et HELLER. — Proc. of the Soc. for exp. biol. and med., 1931, t. 28, p. 423.
12. MARBE. — L'influence des hydrates de carbone (glucose et maltose) sur la production de la toxine diphtérique. Comptes rendus de la Société de Biologie, 1933, t. 112, p. 1489.
13. LOISEAU et PHILIPPE. — Variations du pouvoir antigène de la toxine diphtérique dans ses rapports avec le milieu de culture et le temps d'hydrolyse pepsique des panses de porc. Comptes rendus de la Société de Biologie, 1931, t. 109, p. 266.
14. LOISEAU. — Etude des variations des composants du milieu de culture destiné à la production de la toxine diphtérique. Comptes rendus de la Société de Biologie, 1934, t. 116, p. 1214.
15. BORDET. — Premier congrès des Microbiologistes de la langue française, octobre 1938.
16. HIDA SUZUKI. — Biological and chemical analysis of the diphteria toxin production in media. Kitasato archives of experimental medicine XIV novembre 1937, p. 263 à 313.
17. LOISEAU et PHILIPPE. — Production de la toxine diphtérique dans ses rapports avec le milieu de culture. Comptes rendus de la Société de Biologie, 1934, t. 116, p. 1056.
18. HITCHENS. — *Journal de Médecine Research*, 1905, p. 137.
19. POPE et HEALY. — The influence of maltose on the growth and toxin production of « C. Diphteriae ». *British Journal of exp. Path.*, 1933, t. 14, p. 77.
20. PAPPENHEIMER et JOHNSON. — Studies in diphteria toxin production. A simple gelatine hydrolyrate medium and Some properties of the toxin produced thereon. *British Journal of Exp. Pathology*, juin 1937, t. XVIII, p. 239.
21. POPE. — The production of toxin by « C. Diphteriae ». Effects produce by additions of iron and copper to

- medium. *Journal of Exp. Path.*, XIII, juin 1932, p. 218.
22. BERTHA et GARCIA. — Préparation de toxine et d'anatoxine diphtériques avec le bouillon de Pope et Schmidt modifié. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1933, p. 1289.
23. POPE et SCHMIDT. — *Journal of Pathology and Bacteriology*, 1932, t. 35, p. 573.
24. DERUBY et WALBURN. — Studien über die Bildung des diphterietoxins. *Biochemische Zeitschrift*, 1924, t. 138, p. 476.
25. RAMON. — De la production rapide et intensive de l'antitoxine tétanique chez le cheval. Ses conditions. Ses conséquences. *Revue d'Immunologie*. Septembre 1939, t. 5, n° 5.
26. ABT. — Sur la purification de la toxine diphtérique au moyen des précipités de phosphate de chaux. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1928, t. 42, p. 1336.
27. LEULIER, SÉDAILLAN et Mme CLAVEL. — A propos de la purification de la toxine diphtérique. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1931, p. 1137.
28. SCHMIDT. — Sur le mode de préparation des toxines et anatoxines. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1931, t. 107, p. 327.
29. SPASOVICZ et POREBSKI. — Sur le mode de préparation des toxines et anatoxines diphtériques purifiées et hyperconcentrées. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1933, p. 1267.
30. SCHMIDT. — Studien über den einfluss verschiedeuer aliphatischer und aromatischer Verbindung auf das diphterie toxin. *Bioch. Zeitschrift*, 1932, p. 256, t. 158. — L'hydrate d'alumine sur la toxine et l'anatoxine *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 1932, 9, 3.
31. BOIVIN et IZARD. — Méthode pour la purification à l'acide trichloracétique des toxines et anatoxines diphtériques tétaniques et staphylococciques. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1937, p. 25.
32. MONROE EATON. — The purification and concentration of

- diphtheria toxin. Separation of toxin from bacterial protein. *Journal of Bacteriology*, 1937, p. 139.
33. TORELL et NORLIN. — Hochgereinigtes Diphtherie antigen *Zeitschrift für Immunität*, t. XCI, 10 août 1937, p. 62.
34. EATON et GRONAN. — Comparative studies on the purification of tetanus and diphtheria toxins. *Journal of Bacteriology*, 1938, t. 36, n° 4, p. 423 à 432.
35. PICO FERRARI. — Elévation du titre antitoxique des sérums antidiphtériques par injections d'essence de thérébentine. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1925, p. 1132.
36. RAMON. — Sur l'anatoxine diphtérique à propos d'une note de P. Nélis sur la vaccination antidiphtérique. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1925, p. 1433, t. 92.
37. RAMON. — Sur l'anatoxine diphtérique et sur les anatoxines en général. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. 39, p. 1.
38. RAMON. — *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1925, t. 181, p. 157.
39. RAMON. — Sur la production de l'antitoxine diphtérique. Sur l'immunisation antitétanique et sur la production de l'antitoxine tétanique. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1925, p. 506 et 899, t. 93.
40. RAMON. — Sur l'anatoxine diphtérique et sur les anatoxines en général. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1925, t. 39, p. 1.
41. SCHMIDT. — *Comptes rendus de l'Etat Danois*, 1926, t. XCIV, p. 606.
42. SCHMIDT. — L'hydrate d'alumine sur la toxine et l'anatoxine. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 1932, p. 3.
43. RAMON, LEMETAYER-RICHON. — De l'activité immunisante des mélanges d'anatoxine et de substances adjuvantes. *Revue d'Immunologie*, 1937, p. 202.
44. RAY et DAS. — The Immunization of horses for the production of high titre tetanus antitoxin. *Journal de Médecine Research*, t. 26, n° 1, juillet 1938, p. 317, 320.
45. SORDELLI. — Préparation rapide des sérums actifs.
46. RAMON et DESCOMBEY. — Sur la toxine et sur l'anatoxine

- diphthériques. Pouvoir flocculant et propriétés immunisantes. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1924, t. 38, p. 1. — Vaccination du cheval par l'anatoxine tétanique. *Annales de l'institut Pasteur*, 1926, t. 40, p. 245. — Sur l'immunisation antitétanique et sur la production de l'antitoxine tétanique. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1925, t. 93, p. 508. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1930, t. 103, p. 1202.
47. RAMON et DESCOMBEY. — Sur une méthode de production rapide et intensive de l'antitoxine diphtérique. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1937, t. 124, p. 895.
48. RAMON. — Sur l'aptitude à la production de l'antitoxine tétanique de chevaux antérieurement vaccinés contre le tétanos. *Comptes rendus de la Société de Biologie* 1931, t. 106, p. 21. — RAMON. — Sur la production de l'antitoxine tétanique. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1930, t. 191, p. 1393. — RAMON et LEMETAYER. — Sur méthode de production intensive de l'antitoxine tétanique. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1931, t. 106, p. 23.
49. RAMON. — De l'activité immunisante des mélanges d'anatoxines et de substances adjuvantes. *Revue d'Immunologie*, 1937.
50. MACCOLINI. — La production comparée de l'immunité et de l'antitoxine diphtérique par des injections fractionnées et par injection globale d'anatoxine. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1937, p. 487.
51. Mme INGA FJORD NIELSEN. — Production d'antitoxine au moyen de toxines préparées à partir du milieu de Pope et Llewellyn Smith. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1936, t. 123, p. 725.
52. RAMON. — Sur l'obtention de sérum antidiphtérique et antitétanique de valeur antitoxique élevée. Données expérimentales et techniques. Conséquences pratiques. *Bulletin et Mémoires de la Société Médicale des Hôpitaux de Paris*, le 10 avril 1939.
53. RAMON. — Premier congrès des microbiologistes de la langue française.

54. BORDET. — Sur l'obtention des sérums antidiphtériques et antitétaniques de valeur antitoxique élevé. Données expérimentales et techniques. Conséquences pratiques. Premier congrès des microbiologistes de la langue française.
55. RAMON. — Sur la production de l'antitoxine tétanique, Comptes rendus de l'Académie des Sciences, 1930. t. 191, p. 1393.
56. RAMON. — Comptes rendus de la Société de Biologie, 1925, t. 93, p. 508.
57. RAMON. — Sur une méthode de production intensive de l'antitoxine tétanique. Comptes rendus de la Société de Biologie, 1931, t. 106, p. 23.
58. RAY et DAS. — The immunization of horses for the production of high-titre tetanus antitoxin. *Journal Medicine Resarch*, t. 26, n° 1, juillet 1938, p. 317-320.
59. NUMATA. — On the fate of antitoxin in blood serum in the course of immunisation of horses against the tetanus. Kitasato archives, 1938, p. 7.
60. KORSHUM, NEDRIGAILOFF, OSTRIANINE. — *Koussy Wratch* n° 18, 3-16 mai 1903, p. 672-675.
61. W.-R. HUBBERT. — Bulletin Institut Pasteur, 1905, p. 579.
62. BLUMENTHAL. — Bulletin Institut Pasteur, 1908, t. 6, p. 969.
63. RENAUX. — Importance de l'administration de hautes doses de toxine diphtérique au cheval pour la préparation du sérum antidiphtérique. Comptes rendus de la Société de Biologie, 1923, p. 838.
64. RAMON et RICHOU. — De la production de l'antitoxine diphtérique et de l'obtention rapide du sérum antidiphtérique de valeur antitoxique élevée chez le cheval.
65. RAMON. — De la production rapide et intensive de l'antitoxine tétanique chez le cheval. *Revue d'Immunologie* septembre 1939, t. 5, p. 420.
66. P. SÉDAILLIAN, F. JOURDAN, M^{me} CLAVEL. — Répartition des antitoxines dans le temps. Courbes d'immunisation chez le lapin. *Revue d'immunologie* t. IV n° 4 Juillet 1938, p. 304 à 321.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	11
CHAPITRE PREMIER. — Progrès réalisés dans l'obtention des toxines de titre élevé.....	15
CHAPITRE II. — Progrès réalisés dans la technique d'immunisation des chevaux.....	31
CHAPITRE III. — Les taux sériques obtenus.....	39
CHAPITRE IV. — Résultats obtenus à l'Institut Bactériologique de Lyon.....	43
CONCLUSIONS	51
BIBLIOGRAPHIE	57

LYON
Imprimerie GAUTIER & LAFORET
101, Rue d'Anvers, 101

—
1942

